

University of Groningen

On the cause of multiple sclerosis

Bijlard, Marjolein

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Bijlard, M. (2016). *On the cause of multiple sclerosis: Molecular mechanisms regulating myelin biogenesis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

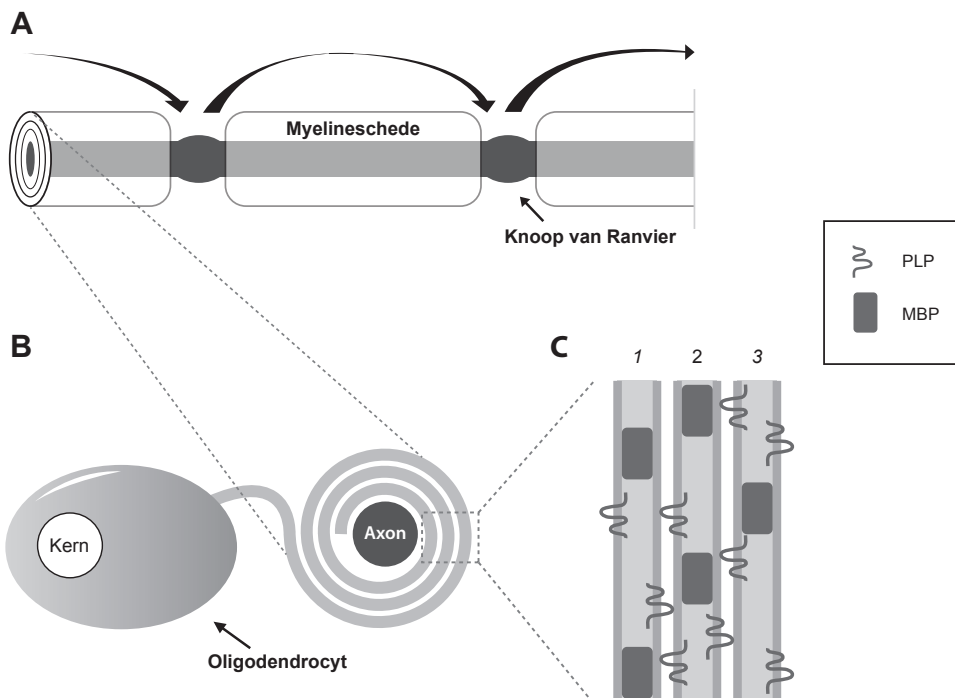
MEER INZICHT IN DE OORZAAK VAN MULTIPLE SCLEROSIS; DE MOLECULAIRE MECHANISMEN DIE DE AANMAAK VAN MYELINE REGULEREN

Multiple Sclerose (MS) is een ziekte met een grillig verloop dat gekenmerkt wordt door uitval van zintuigelijke waarnemingen en bewegingsfunctie. Het verloop per individu is zeer uiteenlopend, maar bestaat veelal uit periodes van aanvallen (relapses of schubs) met klinische achteruitgang, afgewisseld met periodes van (symptomatische) rust en zelfs herstel. De symptomen van MS worden veroorzaakt doordat zenuwimpulsen van en naar de hersenen en het ruggenmerg niet goed via de zenuwuitlopers ('axonen') worden doorgegeven omdat de isolerende laag, het myeline omhulsel, is beschadigd. De myelineschede, bestaande uit veelal vetten, heeft een elektrisch isolerende werking, waardoor de zenuwimpulsen kunnen 'springen' van open plek naar open plek, dat wil zeggen myeline-vrije gebieden op de zenuwuitloper, de zogenaamde knopen van Ranvier (Figuur 1A). Op deze wijze kunnen de zenuwsignalen snel en energetisch efficiënt over grotere afstanden over de axonen doorgegeven worden. Bij MS raakt deze myelinelaag echter beschadigd en afhankelijk van waar in de hersenen en/of het ruggenmerg het myeline wordt aangetast, openbaart zich dit als uitval van bijvoorbeeld spierfuncties, het zicht of sensorische functies. De plaats waar de beschadiging is opgetreden noemt men een laesie. In vroege stadia van MS kan het beschadigde myeline in een laesie zich nog wel herstellen doordat voorloper cellen (OPCs) die in de hersenen aanwezig zijn, een nieuwe myelineschede aanmaken. In latere stadia van MS treedt dit herstel echter niet meer op omdat de voorlopercellen geen nieuw myeline meer aanmaken. Uiteindelijk raakt ook de zenuwuitloper zelf beschadigd door langdurig 'blootliggen'.

Ondanks de prevalentie en impact van een ziekte als MS is de precieze oorzaak (nog) niet bekend en is de therapie die op dit moment wordt toegepast uitsluitend gericht op het voorkomen van verdere klinische achteruitgang en niet zozeer op het herstel van eerder opgelopen schade. Om te begrijpen waarom myeline niet altijd opnieuw kan worden aangemaakt in MS laesies is het belangrijk te weten hoe de myelinemembranen in normale situaties worden gevormd. Immers, door te weten op welke wijze de essentiële myeline componenten worden aangeleverd en ter plekke worden samengevoegd, kan er ook gezocht worden naar manieren om deze processen te verbeteren in de laesies. Het is ook van groot belang om inzicht te krijgen in hoe dit transport en assemblage proces van buiten de cel gestimuleerd zou kunnen worden en welke rol zenuwen en ontstekingsreacties in dat proces (kunnen) spelen. Hiermee zouden nieuwe manieren gevonden kunnen worden om de her-aanmaak van myeline actief te beïnvloeden. Daarom wordt er in dit proefschrift onderzoek gedaan naar factoren die een rol spelen in de (her)aankmaak van myeline.

In de hersenen en het ruggenmerg wordt de myelineschede geproduceerd door oligodendrocyten. Oligodendrocyten zijn een bepaald type hersencellen die lange uitlopers maken die bij contact met een axon zich meerdere malen om het axon wikkelen en zo de myelineschede vormen (Figuur 1B). De myelineschede heeft een unieke samenstelling en bevat een aantal specifieke myeline eiwitten en lipiden. De belangrijkste myeline eiwitten zijn het proteolipid protein (PLP) en myelin basic protein (MBP), die ervoor zorgen dat

de windingen van het myeline strak om het axon liggen (Figuur 1C). Belangrijke lipiden (vetachtige stoffen) zijn de glycosphingolipiden galactosylceramide en sulfatide. Alle hiervoor genoemde eiwitten en lipiden zijn essentiële componenten voor het correct functioneren van het myeline en daarmee voor het efficiënt doorgeven van de zenuwimpuls. Het myeline wordt dus gevormd door de uitlopers van de oligodendrocyt die verrijkt zijn in PLP, MBP en glycosphingolipiden, dit in tegenstelling tot het cellichaam van de oligodendrocyt, waar deze myeline-specifieke componenten in mindere mate of niet voorkomen. Cellen met twee functioneel verschillende en aan het celoppervlak geëxposeerde membraan domeinen worden ook wel gepolariseerde cellen genoemd. De oligodendrocyt is daar een voorbeeld van, omdat het enerzijds een plasmamembraan bezit rondom het cellichaam en anderzijds de myeline membraan als uitstulping daarvan, die zich windt rondom het axon. Oligodendrocyten zijn echter niet de enige gepolariseerde cellen in het lichaam. Een veel bestudeerde gepolariseerd



Figuur 1. De myelineschede rondom een axon ('zenuwuitloper') wordt gevormd door oligodendrocyten

A) De myelineschede omhult het axon, met op regelmatige afstand insnoeringen, de knopen van Ranvier, waar de zenuwimpuls over doorgegeven worden. **B)** De myelineschede wordt gevormd door lange uitlopers van oligodendrocyten die zich meerdere malen dicht om een axon wikkelen. **C)** Belangrijke eiwitten in myeline, MBP en PLP, zorgen voor het dicht tegen elkaar 'aanplakken' van de binnen- en buitenkant van de uitlopers van de oligodendrocyt.

celtype is de epitheelcel, onder andere te vinden in nier, darm en huid. De twee verschillende membraanoppervlakken van gepolariseerde epitheelcellen worden aangeduid met de termen apicaal en basolateraal membraan (Figuur 2A). Het transport van eiwitten en lipiden naar deze verschillende typen membranen vindt plaats via specifieke transportroutes binnen de cel. In eerder uitgevoerd onderzoek is het gepolariseerde karakter van oligodendrocyten onderzocht, waaruit bleek dat ook in oligodendrocyten een soort apicale en basolaterale membranen en de daarbij behorende transportroutes voorkomen. Daarbij is vastgesteld dat de aanvoer van myeline componenten een basolateraal karakter heeft.

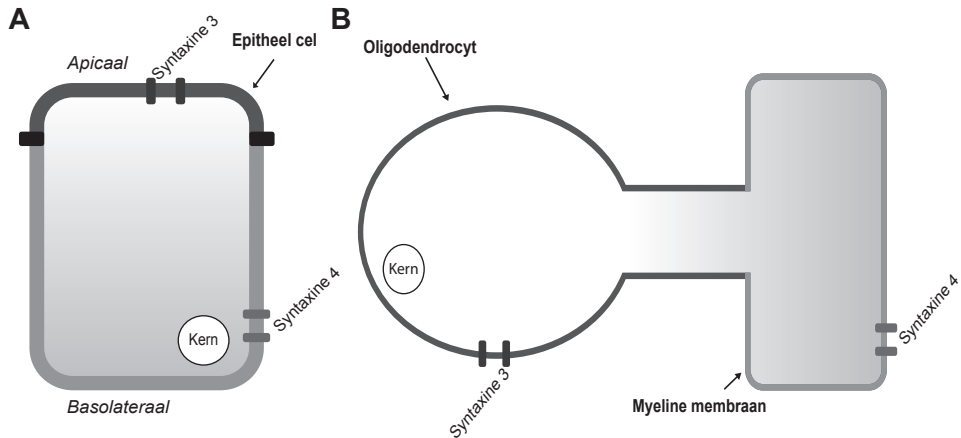
Daarom verwachten we dat we waardevol mechanistisch inzicht kunnen krijgen in de aard van de polarisatie van de oligodendrocyt door te kijken naar eerdere studies, gericht op soortgelijk gepolariseerde epitheelcellen, en waarvan we verwachten dat die kennis zal kunnen bijdragen tot een beter begrip van de vorming van myeline. In **hoofdstuk 1** wordt dan ook een gedetailleerde literatuurstudie beschreven om inzicht te krijgen in hoeverre de membraanpolariteit van oligodendrocyten qua transportroutes lijkt op die van epitheelcellen. In dit hoofdstuk wordt besproken wat er tot nu toe bekend is over de transportroutes van de belangrijkste myeline eiwitten PLP en MBP, en de rol van de in myeline verrijkte galactolipiden galactosylceramide en sulfatide als 'sorteerders' van andere myeline componenten. Maar ook de rol van andere, al bekende 'sorteerders', zoals myeline and lymphocyte protein (MAL) en SNAREs en hun mogelijke rol in polariteit wordt geïnventariseerd. In het bijzonder stellen we hier voor dat, op basis van de werking van een 'common recycling endosome' in epitheelcellen dat belangrijk is voor de instandhouding van hun polariteit, er mogelijk ook een soortgelijk systeem in oligodendrocyten functioneert. Dit wordt mede ondersteund door data omtrent het bestaan van een transcytotische route voor PLP, dat wil zeggen een route van het cellichaam plasmamembraan naar het myeline membraan. Dit type transport is ook beschreven voor gepolariseerd transport en membraanonderhoud, zoals dat wordt aangetroffen in epitheelcellen.

Hierna hebben we verder onderzocht hoe de genoemde processen in de oligodendrocyt werken. Hiervoor zijn experimenten uitgevoerd met in kweek gebrachte (rat) oligodendrocyten en soms ook met zenuwcellen (neuronen). Oligodendrocyten, gegroeid zonder axonen (neuronen), kunnen hun uitlopers nergens omheen wikkelen, maar maken in plaats daarvan een niet-opgerold membraanoppervlak, dat verder alle gelijkenis vertoont met het natuurlijk myeline membraan. Dat wil zeggen, in dit membraan bevinden zich alle componenten (eiwitten en lipiden) die ook in aanwezigheid van zenuwcellen naar de myelinedscheiding zouden worden getransporteerd.

In **hoofdstuk 2** hebben we hiermee laten zien dat de t-SNAREs syntaxine 3 en 4, ankereiwitten in transportprocessen, een polariteit-specifieke verdeling in (gepolariseerde) oligodendrocyten vertonen. Consistent met de gepolariseerde distributie in epitheelcellen, lokaliseert syntaxine 3 aan het 'apicaal-achtige' cellichaam plasmamembraan, terwijl syntaxine 4 lokaliseert in de buurt van het 'basolateraal-achtige' myeline membraan (Figuur 2 A en B). Wanneer de aanmaak van syntaxin 4 in voorlopercellen van oligodendrocyten wordt geblokkeerd, kan er geen MBP eiwit meer worden aangeleverd, omdat de aanmaak van MBP mRNA stopt. Daarentegen veranderden andere myeline-gerichte eiwitten, waaronder PLP, integrine $\alpha 6$ en het virale

model eiwit VSV G, niet in locatie of hoeveelheid. Deze gegevens wijzen dan ook sterk op de hypothese dat het uitschakelen van syntaxine 4 leidt tot een ogenschijnlijk specifieke transcriptie onderdrukking van MBP mRNA. Als we dan kijken naar de functie van syntaxine 4, namelijk het op een specifieke plek laten ‘aanleggen’ van transportblaasjes (Figuur 2), dan is een mechanisme waarbij syntaxine 4 nodig is om een transportblaasje met een nog onbekend component af te leveren waarschijnlijk. We hebben dan ook laten zien dat door het weer toevoegen van die uitgescheiden stof, door middel van geconditioneerd medium van controle cellen, het effect van het uitschakelen van syntaxine 4 opgeheven kan worden. Op deze manier is syntaxine 4 dan ook essentieel bij de autocriene regulering van MBP productie.

In andere eerdere studies is aangetoond dat PLP via transcytotisch transport van het cellichaam-plasmamembraan naar het myelinemembraan wordt vervoerd. Dit proces is afhankelijk van syntaxine 3 en onder invloed van het sphingolipide sulfatide vindt een conformatie verandering in het PLP plaats. Dit ‘signaal’ lijkt er voor te zorgen dat het PLP van het cellichaam plasmamembraan naar het myeline membraan wordt gebracht. Met andere woorden, dit transcytotisch vervoer kan dus zorgen voor een gereguleerde timing van PLP's verschijning in het myeline membraan, waardoor voortijdige ‘verdichting’, wat transport-belemmerend zou kunnen werken, wordt voorkomen. Om de rol van ‘sorterende’ eiwitten hierbij te onderzoeken op gepolariseerd transport, onderzochten we in **hoofdstuk 3** het effect van MAL, een bekende regulator van



Figuur 2. De polarisatie van epitheelcellen en oligodendrocyten vertoont overeenkomsten

A) Epitheelcellen vertonen verschillen in opbouw van één kant van de cel en de andere kant, ook wel aangeduid als apicaal en basolateraal. Ook de ankereiwitten syntaxin 3 en syntaxin 4 bevinden zich specifiek in respectievelijk het apicale dan wel basolaterale membraan. **B)** Oligodendrocyten vertonen ook verschillen in opbouw van membranen, het cellichaam membraan versus het myeline membraan, en ook hier vinden we dat de ankereiwitten syntaxin 3 en syntaxin 4 zich in specifieke delen bevinden. Syntaxin 3 bevindt zich in het cellichaam membraan en syntaxin 4 in het myelinemembraan.

gepolariseerd transport in epitheelcellen en ook aanwezig in volwassen oligodendrocyten, op PLP transport. Onze gegevens suggereren dat MAL niet zozeer het eiwitvervoer in transportblaasjes ('vesicle') van nieuw gesynthetiseerd PLP beïnvloedt, maar dat MAL de laterale scheiding van PLP in afzonderlijke membraan microdomeinen regelt, waarschijnlijk door het moduleren van interacties van PLP met het sphingolipide sulfatide, waardoor PLP direct, dat wil zeggen niet verpakt in een transportvesicle, naar het myelinemembraan kan diffunderen. Wij stellen dan ook voor dat in volwassen oligodendrocyten MAL er voor zorgt dat PLP directe toegang tot het myelinemembraan heeft via laterale diffusie en niet meer via de ingewikkelder transcytotische route.

De vetachtige stof sulfatide is belangrijk voor de aanmaak van MBP in de aanwezigheid van laminine-2, een signaalstof afkomstig van zenuwen, en zodoende ook voor rijping van de oligodendrocyt. Zo is laminine-2 betrokken bij de interacties tussen integrines en groeifactoren, die zich aanvankelijk in afzonderlijke membraan microdomeinen bevinden en die, als ze samen komen, de vertaling van MBP mRNA initiëren. Galactosylceramide en sulfatide zijn belangrijke bestanddelen van dergelijke microdomeinen, terwijl sulfatide ook kan dienen als een receptor voor laminine-2. We onderzochten in **hoofdstuk 4** de relevantie van deze galactolipiden in laminine-2-afhankelijke rijping van de oligodendrocyt, en specifiek de expressie van MBP. Het verstoren van laminine-2-sulfatide interacties belemmert de expressie van MBP en de vorming van myeline membranen. Aangezien aggregaten van fibronectine, een signaalstof aanwezig in MS laesies, maar niet in gezonde gedeeltes van de hersenen, de differentiatie van voorlopercellen van de oligodendrocyt kunnen belemmeren, werd het effect van fibronectine-galactolipide interacties op MBP ook bestudeerd in **hoofdstuk 4**. Hieruit bleek dat fibronectine sulfatide op een verkeerde plek in het membraan plaatst, waardoor de heraanmaak van myeline wordt verstoord. Belangrijk is ook onze waarneming dat de remming van de morfologische differentiatie van oligodendrocyten door fibronectine domineert over de differentiatie-bevorderende effecten van laminine-2. Dit zou kunnen verklaren waarom voorlopercellen van de oligodendrocyt in MS laesies nieuw myeline niet meer aanmaken en biedt mogelijkheden als aangrijpingspunt voor therapie.

De hoeveelheid van de pro-inflammatoire cytokine $\text{TNF}\alpha$ is verhoogd in MS-laesies en draagt bij aan MS pathologie. Daarom hebben we in **hoofdstuk 5** onderzocht wat de specifieke invloed van $\text{TNF}\alpha$ is op oligodendrocyten en myelinevorming. We tonen aan dat in met $\text{TNF}\alpha$ -behandelde volledig ontwikkelde oligodendrocyten het MBP eiwit zich terugtrekt uit de myeline membranen richting het cellichaam. Ook in met $\text{TNF}\alpha$ -behandelde gemyeliniseerde axon kweken was verschil te zien in de lengte van de MBP-positieve myeline segmenten, namelijk dat myeline segmenten korter waren in vergelijking met onbehandelde culturen. Dit kan worden verklaard doordat $\text{TNF}\alpha$ zorgt voor een desorganisatie van het actine cytoskelet (het geraamte van een cel) en dit leidt tot een herverdeling van MBP en galactolipiden van actine-afhankelijke naar actine-onafhankelijke membraan microdomeinen. In het kader van MS kan dit betekenen dat continue blootstelling aan $\text{TNF}\alpha$ in MS-laesies het in stand houden van myeline bemoeilijkt, bovenop het al aangetoonde negatieve effect van $\text{TNF}\alpha$ op differentiatie en overleving van voorlopercellen van de oligodendrocyt.

Alhoewel de in dit proefschrift beschreven bevindingen bijdragen aan het begrip van het mechanisme van myelinisatie is vervolgonderzoek zeker nodig. Een verdere karakterisering van de polarisatie van oligodendrocyten en ook de rol van de myeline-lipiden galactosylceramide en sulfatide op de sortering en transport van de myeline eiwitten dienen verder te worden onderzocht. Verondersteld mag worden dat deze kennis meer inzicht zal geven over de manier waarop het myeline wordt gevormd en hoe dit proces kan worden bevorderd. Deze inzichten zullen bijdragen aan het ontwikkelen van therapieën die mogelijkwerwijs een demyeliniserende ziekte als MS kunnen remmen en/of genezen.

